

QUALITY ASSESSMENT OF TRICHOGRAMMA PARASITOIDS (*Trichogramma* spp.) FROM SIX MEXICAN INSECTARIES

EVALUACIÓN DE CALIDAD DEL PARASITOIDE TRICOGRAMA (*Trichogramma* spp.) PROVENIENTE DE SEIS INSECTARIOS MEXICANOS

Jaime González-Cabrera¹, Hugo C. Arredondo-Bernal^{1*}, Richard Stouthamer²

¹Centro Nacional de Referencia de Control Biológico. Km 1.5 Carretera Tecomán-Estación FFCC. Colonia Tepeyac. 28110. Tecomán, Colima, México. (jgonz017@student.ucr.edu) (hugo.arredondo@senasica.gob.mx). ²Department of Entomology, University of California. Riverside, CA 92521, USA. (richard.stouthamer@ucr.edu).

ABSTRACT

Quality of mass-reared biological control agents is vital. There are reports that *Trichogramma* spp. failed to control the target pest, and poor quality may explain these failures. The first goal of this study was to determine which way of reproduction was practiced by *Trichogramma* spp. colonies from Mexican insectaries, either sexual or asexual, and the second goal was to determine whether those *Trichogramma* spp. colonies meet the quality standards suggested by the International Organization for Biological Control/European Community (IOBC/EC). In March 2010, a letter was sent to 27 *Trichogramma* spp. producers. Six insectaries agreed to participate and sent dead samples of its colonies, a total of 10 colonies. For statistical analysis these colonies were grouped by species, either *Trichogramma pretiosum* or *T. fuentesi*. None of the *Trichogramma* spp. colonies were infected by parthenogenetic-inducing *Wolbachia*, i.e., all colonies reproduced sexually. Therefore, quality standards for sexual species were used: sex ratio (proportion females) ≥ 0.5 , embryonic mortality ≤ 20 %, and total fecundity ≥ 40 eggs. Among the 10 *Trichogramma* spp. colonies there was great uniformity in sex ratio, embryonic mortality and total fecundity, i.e., per species there were not statistical differences among colonies. In sex ratio (0.552 ± 0.038) and embryonic mortality (21 ± 4.48 %) the nine colonies of *T. pretiosum* barely fulfilled the minimum standards suggested by the IOBC/EC. Using hind tibia length as a proxy of total fecundity, the fecundity (37.85 eggs) of nine colonies of *T. pretiosum* and two colonies of *T. fuentesi* fell slightly below the standard suggested by the IOBC/EC. In México only sexual species of *Trichogramma*

RESUMEN

La calidad de los agentes de control biológico producidos masivamente es vital. Existen reportes de que *Trichogramma* spp. no controla la plaga objetivo y su mala calidad puede explicar este fracaso. El primer objetivo de este estudio fue determinar qué forma de reproducción, ya sea sexual o asexual, se practicó en las colonias de *Trichogramma* spp. de insectarios mexicanos, y el segundo objetivo fue determinar si esas colonias de *Trichogramma* spp. cumplen con los estándares de calidad sugeridos por la Organización Internacional para el Control Biológico/Comunidad Europea (IOBC/EC, por sus siglas en inglés). En marzo de 2010, se envió una carta a 27 productores de *Trichogramma* spp. Seis insectarios aceptaron participar y enviaron muestras muertas de sus colonias, un total de 10 colonias. Para el análisis estadístico estas colonias se agruparon por especies, *Trichogramma pretiosum* o *fuentesi*. Ninguna de las colonias de *Trichogramma* spp. estaba infectada de *Wolbachia*, que induce la partenogénesis, es decir, todas las colonias se reprodujeron sexualmente. Por ende, se usaron los estándares de calidad para especies sexuales: proporción sexual (proporción de hembras) ≥ 0.5 , mortalidad embrionaria ≤ 20 % y fecundidad total ≥ 40 huevos. Entre las 10 colonias de *Trichogramma* spp. hubo gran uniformidad en la proporción sexual, la mortalidad embrionaria y la fecundidad total, es decir, no hubo diferencias estadísticas entre las colonias por especie. En la proporción sexual (0.552 ± 0.038) y la mortalidad embrionaria (21 ± 4.48 %), nueve colonias de *T. pretiosum* apenas cumplieron con los estándares mínimos sugeridos por la IOBC/EC. Con la longitud de la tibia posterior como proxy para fecundidad total, la fecundidad (37.85 huevos) de nueve colonias de *T. pretiosum* y dos colonias de *T. fuentesi* se ubicó ligeramente debajo del estándar sugerido por la IOBC/EC. En México se producen sólo especies sexuales de *Trichogramma*, pero con densidades bajas del huésped las especies asexuales (comparadas con las especies sexuales) son más efectivas para controlar

*Author for correspondence ♦ Autor responsable.

Received: September, 2013. Approved: February, 2014.

Published as ARTICLE in Agrobiencia 48: 321-329. 2014.

are mass-reared, but at low host densities asexual species (compared with sexual species) are more effective controlling the target pest. So, Mexican insectary personnel should also rear asexual species, and release one or the other depending of host density.

Key words: *Trichogramma pretiosum*, *Trichogramma fuentesi*, quality control, mass rearing, PI-*Wolbachia*.

INTRODUCTION

T*richogrammas* spp. parasitoids (Hymenoptera, Trichogrammatidae) are used for biological control of lepidopteran pests worldwide. The efficacy of these hymenopterous parasitoids is known; yet, mass-reared *Trichogramma* spp., compared with wild wasps, have a low field performance with respect to survival (Mansfield and Mills, 2002), parasitism rate (Ashley *et al.*, 1973) and host acceptance (Bergeijk *et al.*, 1989). Inadequate field performance of these wasps is caused by cold temperatures, heavy rain, residues of toxic agrochemicals, high parasitoid dispersion or low quality of the reared insects (Keller and Lewis, 1985; Collier and van-Steenwyk, 2004). Most of these causes are beyond the control of insectary personnel, with the exception of monitoring the quality of the reared parasitoids. Low quality of the reared parasitoids is caused by crowding conditions, spoiled and overparasitization of the host eggs (Salt, 1936) or genetic diseases (Antolin, 1999).

Supposedly low quality of mass-reared *Trichogramma* spp. is compensated with massive release of individuals (Bourchier *et al.*, 1993); however, high numbers of low quality individuals do not control the target pests (Dutton *et al.*, 1996). To avoid releasing low quality individuals, quality assessment of mass-reared *Trichogramma* spp. should be done as frequently as possible, *i.e.* every month (Laing and Bigler, 1991; García-González *et al.*, 2005).

Trichogramma spp. populations when infected by parthenogenetic-inducing (PI) bacteria of the genus *Wolbachia* are asexual; PI-*Wolbachia* cause unfertilized eggs to develop into diploid females through gamete duplication (Stouthamer, 1997). Both types of populations, sexual and asexual, are used in biological control projects (Stouthamer, 2003), but in México only sexual species are mass-

la plaga objetivo. Por lo tanto, el personal de los insectarios mexicanos debería también reproducir especies asexuales y liberar una o la otra dependiendo de la densidad del huésped.

Palabras clave: *Trichogramma pretiosum*, *Trichogramma fuentesi*, control de calidad, producción masiva, *Wolbachia*-IP.

INTRODUCCIÓN

Los parasitoides *Trichogramma* spp. (Hymenoptera, Trichogrammatidae) se usan para el control biológico de lepidópteros plaga en el mundo. La eficacia de estos parasitoides himenópteros es conocida; sin embargo, las especies de *Trichogramma* spp. reproducidas masivamente, comparadas con las avispas silvestres, tienen un rendimiento bajo en el campo con respecto a la sobrevivencia (Mansfield y Mills, 2002), la tasa de parasitismo (Ashley *et al.*, 1973) y la aceptación por el huésped (Bergeijk *et al.*, 1989). Temperaturas frías, lluvias abundantes, residuos de agroquímicos tóxicos, alta dispersión del parasitoide o baja calidad de los insectos reproducidos (Keller y Lewis, 1985; Collier y van-Steenwyk, 2004) causan desempeño deficiente en el campo de estas avispas. La mayoría de estas causas están más allá del control del personal del insectario, excepto el monitoreo de la calidad de los parasitoides criados. Condiciones de hacinamiento, pudrimiento y sobreparasitación de los huevos huésped (Salt, 1936), o enfermedades genéticas (Antolin, 1999), causan una calidad baja de los parasitoides reproducidos.

La baja calidad de *Trichogramma* spp. en laboratorio supuestamente se compensa con la liberación masiva de individuos (Bourchier *et al.*, 1993); sin embargo, numerosos individuos de calidad baja no controlan las plagas objetivo (Dutton *et al.*, 1996). Para evitar la liberación de individuos de calidad baja, la evaluación de calidad de *Trichogramma* spp. debe realizarse tan frecuentemente como sea posible, esto es, cada mes (Laing y Bigler, 1991; García-González *et al.*, 2005).

Las poblaciones de *Trichogramma* spp. son asexuales cuando están infectadas por bacterias del género *Wolbachia* que inducen partenogénesis (IP); *Wolbachia*-IP causan que los huevos no fertilizados se desarrollen en hembras diploides a través de la duplicación de gametos (Stouthamer, 1997). Ambos tipos de poblaciones, sexual y asexual, se usan en los proyectos de control biológico (Stouthamer, 2003),

reared (García-González *et al.*, 2005). For quality control of *Trichogramma* spp. sexual species the International Organization for Biological Control/ European Community (IOBC/EC) suggested to measure standards, *i.e.* biological traits, correlated with field performance: sex ratio (proportion females), embryonic mortality and total fecundity (Bigler *et al.*, 1991; van-Lenteren, 2003). Female proportion is important because it is the only sex that kills the pest; embryonic mortality indicates the real number of wasps released into the field; and total fecundity is related to the number of lepidopteran dead eggs. In dead *Trichogramma* spp. samples as a proxy of total fecundity, it is recommended to measure female hind tibia length since it is directly related to its field performance, as larger females (compared with small females) live longer, oviposit a larger number of eggs and find host eggs easier (Kazmer and Luck, 1991; Bai *et al.*, 1992; Bennett and Hoffmann, 1998).

In México, *Trichogramma* spp. parasitoids are the most mass-reared beneficial insects (Williams *et al.*, 2013). These parasitoids are released to protect crops such as apples, sugarcane or tobacco, in approximately 1.5 million ha (Domínguez, 1996). Because of the importance of *Trichogramma* spp. parasitoids as biological control agents, the first goal of this study was to determine which way of reproduction was practiced by 10 *Trichogramma* spp. colonies from six Mexican insectaries, either sexual or asexual; and the second goal was to determine whether the Mexican *Trichogramma* spp. meets the quality control standards (previously mentioned), of the IOBC/EC; such standards are observed by bioproductors of North America and Europe (Bigler *et al.*, 1991; van-Lenteren, 2003). If, at the end of the study low quality is detected, production process tests should be performed; and later on, after detecting the problem, corrective actions could be implemented.

MATERIALS AND METHODS

In March 2010, an e-mail letter stating the objectives of this study was sent to 27 *Trichogramma* spp. producers that were listed in "Directorio de laboratorios reproductores y comercializadores de agentes de control biológico, 2010. Dirección General de Sanidad Vegetal y del Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria/Centro Nacional de Referencia de Control Biológico". Initially, eight producers agreed to participate, but at the end of 2010, just six

pero en México sólo se producen masivamente especies sexuales (García-González *et al.*, 2005). Para controlar calidad de especies sexuales de *Trichogramma* spp., la Organización Internacional para el Control Biológico/Comunidad Europea (IOBC/EC) sugiere medir estándares, es decir, rasgos biológicos correlacionados con rendimiento en campo: proporción sexual (proporción de hembras), mortalidad embrionaria y fecundidad total (Bigler *et al.*, 1991; van-Lenteren, 2003). La proporción de hembras es importante porque es el único sexo que mata a la plaga; la mortalidad embrionaria indica el número real de avispas liberada en el campo; y la fecundidad total se relaciona con el número de huevos muertos de la plaga. En muestras muertas de *Trichogramma* spp., usadas en representación (proxy) de la fecundidad total, se recomienda medir la longitud de la tibia trasera de las hembras ya que está directamente relacionada con su comportamiento en el campo, porque las hembras más grandes (comparadas con otras más pequeñas) viven más tiempo, ovipositan un mayor número de huevos y encuentran huevos de huéspedes más fácilmente (Kazmer y Luck, 1991; Bai *et al.*, 1992; Bennett y Hoffmann, 1998).

Trichogramma spp. son las especies benéficas más reproducidas masivamente por los insectarios en México (Williams *et al.*, 2013). Estos parasitoides se liberan para proteger cultivos como manzana, caña de azúcar o tabaco, en aproximadamente 1.5 millones ha (Domínguez, 1996). Dada la importancia de los parasitoides de *Trichogramma* spp. como agentes de control biológico, el primer objetivo de este estudio fue determinar que forma de reproducción, ya sea sexual o asexual, se practicó en 10 colonias de *Trichogramma* spp. de seis insectarios mexicanos; y el segundo objetivo fue determinar si los *Trichogramma* spp. mexicanos cumplen con los estándares de control de calidad (antes mencionados) de la IOBC/EC; estos estándares son observados por bioproductores en Norteamérica y Europa (Bigler *et al.*, 1991; van-Lenteren, 2003). Si al final del estudio se detecta baja calidad, se deberán realizar pruebas en el proceso de producción; y más adelante, después de detectar el problema, se podrían instrumentar acciones correctivas.

MATERIALES Y MÉTODOS

En marzo de 2010 se envió una carta vía correo electrónico enunciando los objetivos de este estudio a 27 productores de

insectaries sent three samples of each *Trichogramma* colony, a total of 10 independent colonies. The *Trichogramma* samples from these insectaries were obtained as follows. On site, personnel of each insectary put live host egg cards on enclosed containers and let the wasp to emerge. Upon the natural death of the emerged adults these containers were sent to San Luis Río Colorado, Sonora México. One week after the arrival of each sample, these containers were brought for analysis to the Entomology Department of University of California, Riverside, California, USA. To maintain anonymity of these collaborating insectaries, in this study only their geographical location is registered.

To determine whether the populations from the 10 colonies of the six Mexican insectaries were sexual or asexual, PI-*Wolbachia* was searched as follows: per sample, DNA was extracted from 20 wasps. Each wasp was ground in 60 μ L 5 % Chelex-100 (Bio-Rad laboratories, Hercules, California, USA) and 2 μ L proteinase K (20 mg mL⁻¹); the mixture was incubated for 60 min at 55 °C, followed by 10 min at 99 °C (Walsh *et al.*, 1991). Evidence of *Wolbachia* infection was sought using *Wolbachia*-specific PCR primers. The primers W-Specf (AGCTTCGAGTGAAACCAATTC) and W-Specr (CATACCTATTCTGAAGGGATAG) were used to amplify a 438 bp fragment of *Wolbachia* 16S rDNA (Werren and Windsor, 2000). PCR was performed in 25 μ L reactions containing 2 μ L DNA template, 1X PCR-buffer (NEB), 0.2 μ mol L⁻¹ each dATP, dCTP, dGTP, 0.4 μ mol L⁻¹ dUTP, 0.4 μ mol L⁻¹ BSA, 0.2 μ mol L⁻¹ forward and reverse W-spec PCR primers, 1 U Taq polymerase enzyme, and 12.3 μ L sterile distilled water. PCR was performed using a thermocycler Ep gradient S (Eppendorf AG, Hamburg, Germany). The cycling program was 2 min at 94 °C, 45 cycles of 0.5 min at 94 °C, 45 s at 55 °C and 1.5 min at 72 °C, followed by 10 min at 72 °C after the last cycle. To determine that *Wolbachia*-DNA amplified successfully, in each PCR reaction a *Trichogramma pretiosum*-DNA known to be infected by *Wolbachia* was included. PCR products were separated on a 1 % agarose gel and stained with ethidium bromide; size ladders were run along with the samples for reference. PCR products and ladders were photographed with a Carestream Molecular Imaging V5.0.2.3.0 (Carestream Health, Inc., Rochester, New York, USA).

Along with the detection of PI-*Wolbachia*, the *Trichogramma* spp. samples from the 10 colonies were analyzed for their sex ratio, embryonic mortality and female hind tibia length, as follows: Sex ratio, or number of females divided by the total number of adults in the sample, was determined from 100 adults. Male or female detection was based in the shape of the antennae (Pinto and Stouthamer, 1994). Embryonic mortality of the *Trichogramma* spp. samples was estimated checking 100 black eggs for the presence of an unemerged wasp or an emergence hole. Parasitized

Trichogramma spp. listados en el “Directorio de Laboratorios Reproductores y Comercializadores de Agentes de Control Biológico, 2010. Dirección General de Sanidad Vegetal y del Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria/Centro Nacional de Referencia de Control Biológico”. Inicialmente, ocho productores accedieron a participar, pero al final de 2010, sólo seis insectarios enviaron tres muestras de cada colonia de *Trichogramma*, un total de 10 colonias independientes. Las muestras de *Trichogramma* de estos insectarios se obtuvieron como se describe a continuación. En el sitio, empleados de cada insectario colocaron tarjetas con huevos parasitados en contenedores cerrados y permitieron que las avispas emergieran. Después de la muerte natural de los adultos que emergieron, estos contenedores se enviaron a San Luis Río Colorado, Sonora, México. Una semana después de la llegada de cada muestra, los contenedores se llevaron al Departamento de Entomología de la Universidad de California, en Riverside, California, EE.UU., para su análisis. Para guardar el anonimato de los insectarios que colaboraron, en este estudio sólo se mencionó su ubicación geográfica.

Para determinar si las poblaciones de las 10 colonias provenientes de los seis insectarios mexicanos eran sexuales o asexuales, se buscó *Wolbachia*-IP de la siguiente forma: por muestra se extrajo ADN de 20 avispas. Cada avispa se molió en 60 μ L 5 % Chelex-100 (laboratorios Bio-Rad, Hercules, California, EE.UU.) y 2 μ L de proteína K (20 mg mL⁻¹); la mezcla se incubó por 60 min a 55 °C, seguido de 10 min a 99 °C (Walsh *et al.*, 1991). Con iniciadores de PCR específicos para *Wolbachia*, se buscó evidencia de infección por *Wolbachia*. Los iniciadores W-Specf (AGCTTCGAGTGAAACCAATTC) y W-Sper (CATACCTATTCTGAAGGGATAG) se usaron para amplificar un fragmento de 438 bp de *Wolbachia* 16S rDNA (Werren y Windsor, 2000). Un termociclador Ep de gradiente S (Eppendorf AG, Hamburgo, Alemania) se usó para realizar el PCR, en reacciones de 25 μ L que contenían 2 μ L de ADN molde, 1X solución amortiguador para PCR (NEB), 0.2 μ mol L⁻¹ cada uno de dATP, dCTP, dGTP, 0.4 μ mol L⁻¹ de dUTP, 0.4 μ mol L⁻¹ de BSA, 0.2 μ mol L⁻¹ de iniciadores PCR W-spec (sentido y antisentido), 1 U Taq enzima polimerasa y 12.3 μ L de agua destilada estéril. El programa de ciclo fue 2 min a 94 °C, 45 ciclos de 0.5 min a 94 °C, 45 s a 55 °C y 1.5 min a 72 °C, seguido de 10 min a 72 °C después del último ciclo. Para determinar que el ADN de *Wolbachia* se amplificó con éxito, en cada reacción PCR se incluyó ADN de *Trichogramma pretiosum* infectado por *Wolbachia*. Los productos del PCR se separaron en un gel de 1 % de agarosa y se tiñeron con bromuro de etidio; junto con las muestras, para referencia, se corrieron marcadores de escalera molecular. Los productos de PCR y los marcadores de escalera se fotografiaron con Carestream Molecular Imaging V5.0.2.3.0 (Carestream Health, Inc., Rochester, New York, EUA).

host eggs turn black once parasitoid larvae reach its prepupal stage. The measurements of sex ratio and embryonic mortality were taken using a V8 Zeiss® stereo microscope. To estimate female hind tibia length, per *Trichogramma* spp. sample, the length of the hind tibia of 30 females was measured as described by Bennett and Hoffmann (1998), but instead of Hoyer's mounting medium, water was used. These measurements were taken with an optical micrometer mounted in the 40X-ocular of a phase contrast microscope Axioskop 40 Zeiss®.

The taxonomic identity of the three samples from the 10 *Trichogramma* spp. colonies was previously determined (publication in progress). So, to perform statistical analysis, the samples were grouped by species: eight colonies of *Trichogramma pretiosum* and two colonies of *Trichogramma fuentesi* in the first sample, and nine colonies of *T. pretiosum* and one colony of *T. fuentesi* in the last two samples. Differences by species in sex ratio and embryonic mortality were calculated using one-way ANOVA, in which the samples were taken as repetitions; and statistical differences in female hind tibia length were calculated through a two-way ANOVA (sample and colony). These statistical tests were performed using SAS (SAS Institute Inc. 2011), with Tukey correction ($p \leq 0.05$). All experimental data, including sex ratio, conformed to the ANOVA assumptions: random selection of individuals, equality of variances and normality of the residuals.

RESULTS AND DISCUSSION

None of the samples from the 10 colonies of the six Mexican insectaries were infected by PI-*Wolbachia*; then, based in the work of Stouthamer (1997) it was concluded that these *Trichogramma* spp. populations, either *T. pretiosum* or *T. fuentesi*, were sexual populations. This result is similar to other studies of Mexican insectaries, in which only sexual species of *Trichogramma* spp. were found (García-González *et al.*, 2005). In other countries, besides the rearing of sexual species of *Trichogramma* spp., they reared and field released asexual species too. Sexual wasps are released at high host densities; and later on, when the pest density is reduced, asexual wasps are released (Stouthamer, 2003). Consequently, Mexican insectary personnel should also rear asexual species, and release one or the other depending of host density. Mexico has asexual populations of *Trichogramma* spp. (Stouthamer and Luck, 1993; Stouthamer and Werren, 1993); so it should be no problem to get the initial rearing stock. The main concern to release asexual *Trichogramma* spp. is that they will extinct the sexual types; yet

Junto con la detección de *Wolbachia*-IP, las muestras de *Trichogramma* spp. de las 10 colonias se analizaron para conocer su proporción sexual, mortalidad embrionaria y longitud de la tibia trasera de las hembras, de la siguiente manera: la proporción sexual, o número de hembras dividido por el número total de adultos en la muestra, se determinó a partir de 100 adultos. La identificación de machos y hembras se basó en la forma de las antenas (Pinto y Stouthamer, 1994). La mortalidad embrionaria de las muestras de *Trichogramma* spp. se evaluó al revisar 100 huevos negros por la presencia de una avispa no emergida o de un hoyo de emergencia. Los huevos de huéspedes parasitados se vuelven negros cuando las larvas del parasitoide llegan a su etapa prepupal. Las medidas de proporción sexual y mortalidad embrionaria se tomaron usando un microscopio estereó V8 Zeiss®. Para conocer la longitud de la tibia trasera de las hembras, por muestra de *Trichogramma* spp., se midió el largo de la tibia trasera de 30 hembras, según lo descrito por Bennett y Hoffmann (1998), pero en lugar de usar medio de montaje de Hoyer, se usó agua. Estas medidas se tomaron con un micrómetro óptico montado en el ocular-40X de un microscopio de contraste de fases Axioskop 40 Zeiss®.

La identidad taxonómica de las tres muestras de las 10 colonias de *Trichogramma* spp. se determinó con anterioridad (publicación en proceso). Así, para realizar análisis estadísticos las muestras se agruparon por especie: ocho colonias de *Trichogramma pretiosum* y dos colonias de *Trichogramma fuentesi* en la primera muestra, y nueve colonias de *T. pretiosum* y una colonia de *T. fuentesi* en las dos últimas muestras. Las diferencias por especie en proporción sexual y mortalidad embrionaria se calcularon usando un ANDEVA de un factor, en la que las muestras se tomaron como repeticiones; las diferencias estadísticas en la longitud de tibia trasera de las hembras se calcularon con un ANDEVA de dos factores (muestra y colonia). Para estas pruebas estadísticas se usó SAS (SAS Institute Inc. 2011), con corrección de Tukey ($p \leq 0.05$). Todos los datos experimentales, incluyendo proporción sexual, se ajustaron a las suposiciones de ANDEVA: selección aleatoria de individuos, igualdad de varianzas y normalidad de los residuales.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Ninguna de las muestras de las 10 colonias de los seis insectarios mexicanos estaban infectadas por *Wolbachia*-IP; por lo tanto, con base en el estudio de Stouthamer (1997) se concluyó que estas poblaciones de *Trichogramma* spp., ya sea *T. pretiosum* o *T. fuentesi*, fueron poblaciones sexuales. Este resultado es similar al de otros estudios de insectarios mexicanos, en los que sólo se encontraron especies sexuales

in the field both types of populations often coexist (Stouthamer and Luck, 1993; Stouthamer *et al.*, 2001), and the percentage of asexual populations is smaller than 11 % (Pinto *et al.*, 1997; Stouthamer *et al.*, 2001).

In sex ratio and embryonic mortality (Table 1) of *T. pretiosum* there were not statistical differences ($p>0.05$) among colonies. In average, the nine colonies of the six Mexican insectaries that produced *T. pretiosum* had a sex ratio (proportion females) of 0.552 ± 0.038 and an embryonic mortality of 21 ± 4.48 %. In both variables, these colonies of *T. pretiosum* barely fulfilled the minimum standards suggested by the IOBC/EC, which are a sex ratio (proportion females) ≥ 0.5 and an embryonic mortality ≤ 20 . Colonies of *T. pretiosum* from USA have a higher sex ratio (≥ 0.87) and a lower embryonic mortality (10 ± 4.8) than the Mexican colonies of *T. pretiosum*, but these USA-colonies are asexual populations, *i.e.*, they reproduce by parthenogenesis (Heimpel and Lundgren, 2000; Lundgren and Heimpel, 2003). A literature search did not show studies about biological parameters of mass reared sexual *Trichogramma* spp.; then, no comparison with others sexual colonies were

de *Trichogramma* spp. (García-González *et al.*, 2005). En otros países, además de producir especies sexuales de *Trichogramma* spp., también reproducen y liberan al campo especies asexuales. Las avispas sexuales se liberan con densidades altas de huésped; y más tarde, cuando la densidad de plaga se reduce, se liberan avispas asexuales (Stouthamer, 2003). En consecuencia, el personal de insectarios mexicanos debería de reproducir también especies asexuales, y liberar un tipo o el otro dependiendo de la densidad del huésped. México tiene poblaciones asexuales de *Trichogramma* spp. (Stouthamer y Luck, 1993; Stouthamer y Werren, 1993), por lo que no debería existir problema en la obtención del stock inicial de reproducción. La preocupación principal de liberar *Trichogramma* spp. asexuales es que extinguirán los tipos sexuales; no obstante, en el campo ambos tipos de poblaciones a menudo coexisten (Stouthamer y Luck, 1993; Stouthamer *et al.*, 2001) y el porcentaje de poblaciones asexuales es menor de 11 % (Pinto *et al.*, 1997; Stouthamer *et al.*, 2001).

En proporción sexual y mortalidad embrionaria (Cuadro 1) de *T. pretiosum*, no hubo diferencias estadísticas ($p>0.05$) entre las colonias. En promedio, las

Table 1. Sex ratio, embryonic mortality and hind tibia length of *Trichogramma* spp. reared in six Mexican insectaries during 2010.

Cuadro 1. Proporción sexual, mortalidad embrionaria y longitud de la tibia trasera de *Trichogramma* spp. reproducidos en seis insectarios mexicanos durante 2010.

Insectary location	Colony number	Sex ratio (proportion females)		Embryonic mortality (%)		Hind tibia length (mm)	
		T. pret. [‡]	T. fuen.	T. pret.	T. fuen.	T. pret.	T. fuen.
1. Baja C. S. [†]	1	0.576 $\pm$ 0.038a		23.52 $\pm$ 5.62a		0.139 $\pm$ 0.001a	
2. Coahuila	2	0.566 $\pm$ 0.038a		18.33 $\pm$ 4.48a		0.142 $\pm$ 0.001a	
	3		§		§		0.139 $\pm$ 0.002a
3. Colima	4	0.506 $\pm$ 0.038a		13.66 $\pm$ 4.48a		0.141 $\pm$ 0.001a	
	5	0.503 $\pm$ 0.038a		14 $\pm$ 4.48a		0.142 $\pm$ 0.001a	
4. Durango	6	0.526 $\pm$ 0.047a	§	23.02 $\pm$ 5.62a	§	0.139 $\pm$ 0.001a	0.139 $\pm$ 0.001a
5. Sonora	7	0.606 $\pm$ 0.038a		23 $\pm$ 4.48a		0.141 $\pm$ 0.001a	
	8	0.546 $\pm$ 0.038a		22 $\pm$ 4.48a		0.139 $\pm$ 0.001a	
6. Sonora	9	0.566 $\pm$ 0.038a		31.66 $\pm$ 4.48a		0.138 $\pm$ 0.001a	
	10	0.56 $\pm$ 0.038a		24 $\pm$ 4.48a		0.137 $\pm$ 0.001a	

[†]Baja California Sur; [‡]T. pret.: *T. pretiosum*, T. fuen.: *T. fuentesi*. [§]Originally there were two colonies of *T. fuentesi*, but in the last two samples one colony of *T. fuentesi* was replaced by *T. pretiosum*; so, it was not possible to perform statistical analysis. Means and S.E. with different letter in a column are statistically different ($p\leq 0.05$) * [†]Baja California Sur; [‡]T. pret.: *T. pretiosum*, T. fuen.: *T. fuentesi*. [§]Originalmente había dos colonias de *T. fuentesi*, pero en las dos últimas muestras una colonia de *T. fuentesi* fue reemplazada por *T. pretiosum*; por ende, no fue posible realizar el análisis estadístico. Las medias y D.E. con distintas letras en una columna son estadísticamente diferentes ($p\leq 0.05$).

made in sex ratio, embryonic mortality or hind tibia length.

Between *T. pretiosum* and *T. fuentesi* there were not statistical differences ($p > 0.05$) among colonies in hind tibia length (Table 1). The IOBC/EC does not have quality standards for this morphological trait or any other measurement of body length. However, female hind tibia length and fecundity are highly correlated (Kazmer and Luck, 1991; Bai *et al.*, 1992; Bennett and Hoffmann, 1998); so, this morphological trait was used as a proxy of total fecundity. The *T. pretiosum* and *T. fuentesi* colonies, considered as whole, had a hind tibia length of 0.140 ± 0.001 and 0.139 ± 0.001 mm, respectively; based on the work of Bai *et al.* (1992), females with hind tibia length of this size will lay a total of 37.85 eggs. Since the IOBC/EC suggests a total fecundity ≥ 40 eggs in quality control tests of *Trichogramma* spp. parasitoids, the fecundity of these *T. pretiosum* and *T. fuentesi* females (the ones here studied) fell slightly below the standard suggested by this international organism.

Among the 10 colonies of the six Mexican insectaries, there was a great uniformity (as shown by the statistical analysis) in lack of PI-*Wolbachia* infection, sex ratio, embryonic mortality and hind tibia length. Such uniformity was shown in this (data not shown) and others studies; the Mexican insectaries used the Angoumois grain moth *Sitotroga cerealella* (Lepidoptera: Gelechiidae) as host eggs (García-González *et al.*, 2005) and they reared almost exclusively *T. pretiosum* (García-González *et al.*, 2005; España-Luna *et al.*, 2008). This uniformity was not a surprise because in México there is a National Reference Center for Biological Control (CNRCB) that used to transfer technology to *Trichogramma* spp. producers (Domínguez, 1996); consequently, many insectaries should have similar technology and rearing procedures. As said before, in Mexico there are 27 *Trichogramma* spp. producers, but only six insectaries agreed to collaborate in this study. Thus, these results are only a population sample and, probably, if more insectaries were included the results could vary.

To measure the quality of *Trichogramma* spp. parasitoids, other tests different than the ones here performed, were suggested; for example walking speed or flight length; but such tests do not correlate with *Trichogramma* spp. field performance

nueve colonias de los seis insectarios mexicanos que produjeron *T. pretiosum* tuvieron una proporción sexual (proporción de hembras) de 0.552 ± 0.038 y mortalidad embrionaria de 21 ± 4.48 %. Para ambas variables, estas colonias de *T. pretiosum* apenas cumplieron con los estándares mínimos sugeridos por la IOBC/EC, que son proporción sexual (proporción de hembras) ≥ 0.5 y mortalidad embrionaria ≤ 20 . Las colonias de *T. pretiosum* de EE.UU. tienen una proporción sexual mayor (≥ 0.87) y menor mortalidad embrionaria (10 ± 4.8) que las colonias mexicanas de *T. pretiosum*, pero estas colonias de EE.UU. son poblaciones asexuales, es decir, se reproducen por partenogénesis (Heimpel y Lundgren, 2000; Lundgren y Heimpel, 2003). En la literatura no se encontraron estudios sobre parámetros biológicos para *Trichogramma* spp. sexuales producidos masivamente; por ende, no se hizo una comparación con otras colonias sexuales en proporción sexual, mortalidad embrionaria o longitud de tibia trasera.

Entre *T. pretiosum* y *T. fuentesi* no hubo diferencias estadísticas ($p > 0.05$) entre las colonias en términos de longitud de tibia trasera (Cuadro 1). La IOBC/EC no tiene estándares de calidad para este rasgo morfológico u otra medida de longitud del cuerpo. Sin embargo, la longitud de la tibia trasera de las hembras y la fecundidad están altamente correlacionadas (Kazmer y Luck, 1991; Bai *et al.*, 1992; Bennett y Hoffmann, 1998); entonces, este rasgo morfológico se usó como proxy de la fecundidad total. Las colonias de *T. pretiosum* y *T. fuentesi*, consideradas en total, tuvieron una longitud de tibia trasera de 0.140 ± 0.001 y 0.139 ± 0.001 mm, respectivamente; con base en el estudio de Bai *et al.* (1992), las hembras con longitud de la tibia trasera de este tamaño depositarán un total de 37.85 huevos. Dado que la IOBC/EC sugiere una fecundidad total ≥ 40 en pruebas de control de calidad de parasitoides de *Trichogramma* spp., la fecundidad de estas hembras *T. pretiosum* y *T. fuentesi* (aquí estudiadas) fue levemente menor al estándar sugerido por este organismo internacional.

Entre las 10 colonias de los seis insectarios mexicanos hubo gran uniformidad (como lo muestran los análisis estadísticos) en ausencia de infección por *Wolbachia*-IP, proporción sexual, mortalidad embrionaria y longitud de la tibia trasera. Esta uniformidad se mostró en éste (datos no mostrados) y otros estudios; los insectarios mexicanos usaron

(van-Lenteren *et al.*, 2003). Thus, currently, the tests here performed are the best choice to measure the quality of mass reared *Trichogramma* spp.

CONCLUSIONS

The 10 *Trichogramma* spp. colonies from the six Mexican insectaries, either *T. pretiosum* or *T. fuentesi*, were sexual populations. In sex ratio and embryonic mortality, the nine colonies of *T. pretiosum* barely met the minimum quality standards suggested by the International Organization for Biological Control/European Community (IOBC/EC). Similarly, using female hind tibia length as a proxy of total fecundity, the fecundity of nine colonies of *T. pretiosum* and two colonies of *T. fuentesi* fell slightly below the quality standards suggested by the IOBC/EC. Among the 10 *Trichogramma* spp. colonies, there was great uniformity in sex ratio, embryonic mortality, total fecundity and lack of PI-*Wolbachia* infection.

ACKNOWLEDGEMENTS

Thanks to Paul Rugman-Jones for his guidance in the molecular analysis and for proof reading the article; to Anabel Valencia Villalobos and Marco Antonio Mellin Rosas for their coordination on the delivery of *Trichogramma* samples; and special thanks to the personnel of the collaborating insectaries. This research was supported in whole or in part by UC MEXUS-CONACYT agreement in higher education and research, Robert and Peggy van den Bosch Memorial Scholarship, and the University of California, campus Riverside, Entomology Department.

LITERATURE CITED

- Antolin, M. F. 1999. A genetic perspective on mating systems and sex ratios of parasitoid wasps. *Res. Popul. Ecol.* 41(1): 29-37.
- Ashley, T. R., D. González, and T. F. Leigh. 1973. Reduction in effectiveness of laboratory-reared *Trichogramma*. *Environ. Entomol.* 2(6): 1069-1073.
- Bai, B. R., R. F. Luck, L. Forster, B. Stephens, and J. A. M. Janssen. 1992. The effect of host size on quality attributes of the egg parasitoid, *Trichogramma pretiosum*. *Entomol. Exp. Appl.* 64(1): 37-48.
- Bennett, D. M., and A. A. Hoffmann. 1998. Effects of size and fluctuating asymmetry on field fitness of the parasitoid *Trichogramma carverae* (Hymenoptera: Trichogrammatidae). *J. Anim. Ecol.* 67(4): 580-591.
- Bergeijk, K. E. V., F. Bigler, N. K. Kaashoek, and G. A. Pak. 1989. Changes in host acceptance and host suitability as an

la palomilla de los graneros *Sitotroga cerealella* (Lepidoptera: Gelechiidae) como huevo huésped (García-González *et al.*, 2005) y reprodujeron casi exclusivamente *T. pretiosum* (García-González *et al.*, 2005; España-Luna *et al.*, 2008). Esta uniformidad no fue una sorpresa porque en México hay un Centro Nacional de Referencia de Control Biológico (CNRCB) que solía transferir tecnología a los productores de *Trichogramma* (Domínguez, 1996); en consecuencia, muchos insectarios deben tener tecnología y procedimientos de reproducción similares. Como ya se dijo, en México hay 27 productores de *Trichogramma* spp., pero sólo seis insectarios accedieron a colaborar en este estudio. Así, estos resultados son sólo una muestra de la población y, probablemente, si más insectarios se incluyeran los resultados podrían variar.

Para medir la calidad de los parasitoides de *Trichogramma* spp., se han sugerido otras pruebas distintas a las realizadas aquí, por ejemplo la velocidad al caminar o la longitud de vuelo, pero, estas pruebas no se correlacionan con el desempeño en campo de *Trichogramma* spp. (van-Lenteren *et al.*, 2003). Por ende, actualmente, las pruebas realizadas aquí son la mejor opción para medir la calidad de *Trichogramma* spp. reproducido masivamente.

CONCLUSIONES

Las 10 colonias de *Trichogramma* spp. de los seis insectarios mexicanos, ya sea *T. pretiosum* o *T. fuentesi*, fueron poblaciones sexuales. En proporción sexual y mortalidad embrionaria, las nueve colonias de *T. pretiosum* apenas cumplieron con los estándares de calidad mínimos sugeridos por la Organización Internacional para el Control Biológico/Comunidad Europea (IOBC/EC). De forma similar, utilizando la tibia trasera de las hembras como proxy para fecundidad total, la fecundidad de nueve colonias de *T. pretiosum* y dos colonias de *T. fuentesi* se ubicó ligeramente debajo de los estándares de calidad sugeridos por la IOBC/EC. Entre las 10 colonias de *Trichogramma* spp. hubo gran uniformidad en proporción sexual, mortalidad embrionaria, fecundidad total y ausencia de infección de *Wolbachia*-IP.

—Fin de la versión en Español—



- effect of rearing *Trichogramma maidis* on a factitious host. Entomol. Exp. Appl. 52(3): 229-238.
- Bigler, F., F. Cerutti, and J. Laing. 1991. First draft of criteria for quality control (product control) of *Trichogramma*. In: Bigler F. (ed). Proceedings of the fifth workshop of the IOBC global working group 'quality control of mass reared arthropods'. Wageningen, Netherland. pp: 200-201.
- Bourchier, R. S., S. M. Smith, and S. J. Song. 1993. Host acceptance and parasitoid size as predictors of parasitoid quality for mass-reared *Trichogramma minutum*. Biol. Control. 3(2): 135-139.
- Collier, T., and R. van-Steenwyk. 2004. A critical evaluation of augmentative biological control. Biol. Control. 31(2): 245-256.
- Domínguez, E. R. 1996. Control biológico de plagas agrícolas en México. In: Zapatero, M. C. (ed). El Control Biológico en América Latina. IOBC. Buenos Aires, Argentina. pp: 55-62.
- Dutton, A., F. Cerutti, and F. Bigler. 1996. Quality and environmental factors affecting *Trichogramma brassicae* efficiency under field conditions. Entomol. Exp. Appl. 81(1): 71-79.
- España-Luna, M. P., A. González-Hernández, O. G. Alvarado-Gómez, y J. Lozano-Gutiérrez. 2008. Identificación molecular de especies cripticas de *Trichogramma* Westwood (Hymenoptera: Trichogrammatidae) de importancia agrícola en México. Acta Zool. Mex. 24(1): 1-14.
- García-González, F., A. González-Hernández, y M. P. España-Luna. 2005. Especies de *Trichogramma* Westwood (Hymenoptera: Trichogrammatidae) presentes en centros reproductores de México. Acta Zool. Mex. 21(3): 125-135.
- Heimpel, G. E., and J. G. Lundgren. 2000. Sex ratios of commercially reared biological control agents. Biol. Control. 19(1): 77-93.
- Kazmer, D. J., and R. F. Luck. 1991. Female body size, fitness and biological control quality: field experiments with *Trichogramma pretiosum*. In: Wajnberg, E., and S. B. Vinson (eds). *Trichogramma* and Other Egg Parasitoids. 3rd Int. Symp. INRA. Paris, France. pp: 37-40.
- Keller, M. A., and W. J. Lewis. 1985. Movements by *Trichogramma pretiosum* (Hymenoptera, Trichogrammatidae) released into cotton. Southwest Entomol. 8(1): 99-109.
- Laing, J. E., and F. Bigler. 1991. Quality control of mass-produced *Trichogramma* species. In: Bigler, F. (ed). Proceedings of the fifth workshop of the IOBC global working group 'quality control of mass reared arthropods'. Wageningen, Netherland. pp: 111-118.
- Lundgren, J. G., and G. E. Heimpel. 2003. Quality assessment of three species of commercially produced *Trichogramma* and the first report of thelytoky in commercially produced *Trichogramma*. Biol. Control. 26(1): 68-73.
- Mansfield, S., and N. J. Mills. 2002. Direct estimation of the survival time of commercially produced adult *Trichogramma platneri* Nagarkatti (Hymenoptera: Trichogrammatidae) under field conditions. Biol. Control. 25(1): 41-48.
- Pinto, J. D., and R. Stouthamer. 1994. Systematics of the Trichogrammatidae with emphasis on *Trichogramma*. In: Wajnberg, E., and S. A. Hassan (eds). Biological Control with Egg Parasitoids. CAB International. Wallingford, UK. pp: 1-36.
- Pinto, J. D., R. Stouthamer, and G. R. Platner. 1997. A new cryptic species of *Trichogramma* from the Mojave desert of California as determined by morphological, reproductive and molecular data. P. Entomol. Soc. Wash. 99(2): 238-247.
- Salt, G. 1936. Experimental studies in insect parasitism IV. The effect of superparasitism on populations of *Trichogramma evanescens*. J. Exp. Biol. 13(3): 363-375.
- SAS Institute Inc. 2011. SAS/STAT® 9.2. User's guide. Cary, NC.
- Stouthamer, R. 1997. *Wolbachia*-induced parthenogenesis. In: O'Neill, S. L., A. A. Hoffman, and J. H. Werren (eds). Influential Passengers: Inherited Microorganisms and Arthropod Reproduction. Oxford University Press. New York, USA. pp: 102-124.
- Stouthamer, R. 2003. The use of unisexual wasps in biological control. In: van-Lenteren, J. C. (ed). Quality Control and Production of Biological Control Agents. Theory and Testing Procedures. CABI Publishing. Wallingford, UK. pp: 73-87.
- Stouthamer, R., and J. H. Werren. 1993. Microbes associated with parthenogenesis in wasps of the genus *Trichogramma*. J. Invertebr. Pathol. 61(1): 6-9.
- Stouthamer, R., and R. F. Luck. 1993. Influence of microbe-associated parthenogenesis on the fecundity of *Trichogramma deion* and *Trichogramma pretiosum*. Entomol. Exp. Appl. 67(2): 183-192.
- Stouthamer, R., M. van-Tilborg, J. H. de-Jong, L. Nunney, and R. F. Luck. 2001. Selfish element maintains sex in natural populations of a parasitoid wasp. Proc. Royal Soc. London B Biol. 268(1467): 617-622.
- van-Lenteren, J. C. 2003. Preface. In: van-Lenteren, J. C. (ed). Quality Control and Production of Biological Control Agents. Theory and Testing Procedures. CABI Publishing. Wallingford, UK. pp: IX-X.
- van-Lenteren, J. C., A. Hale, J. N. Klapwijk, J. V. Schelt, and S. Steinberg. 2003. Guidelines for quality control of commercially produced natural enemies. In: van-Lenteren, J. C. (ed). Quality Control and Production of Biological Control Agents. Theory and Testing Procedures. CABI Publishing. Wallingford, UK. pp: 265-303.
- Walsh, P. S., D. Metzger, and R. Higuchi. 1991. Chelex-100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. Biotechniques 10: 506-513.
- Werren, J. H., and D. M. Windsor. 2000. *Wolbachia* infection frequencies in insects: evidence of a global equilibrium? P. Roy. Soc. Lond. B Biol. 267(1450): 1277-1285.
- Williams, T., H. C. Arredondo-Bernal, and L. A. Rodríguez-del-Bosque. 2013. Biological pest control in México. Annu. Rev. Entomol. 2013(58): 119-40.